

明 細 書

腫瘍組織の酸素濃度を上昇させるためのポルフィリン酸素輸液製剤

技術分野

本発明は、腫瘍組織を有する哺乳動物に投与し、その腫瘍組織内低酸素領域
5 の酸素分圧を高めるために使用される、腫瘍組織の酸素濃度を上昇させるため
のポルフィリン酸素輸液製剤に関する。

背景技術

生体内では、赤血球中のヘモグロビンが酸素運送の役割を担っている。この
10 ヘモグロビンの酸素結合席であるプロトポルフィリン鉄（I I）錯体と類似の
酸素輸送機能を合成の化合物で再現しようとする研究は、これまで数多く報告
されており、例えばその先駆的な例としては、J. P. Collman, Acc. Chem. Res
10, 265 (1977)、F. Basolo, B. M. Hoffman, J. A. ibers, ibid, 8, 384
15 (1975)等がある。特に室温下で安定な酸素錯体を形成できるポルフィリン鉄
（I I）錯体としては、5, 10, 15, 20-テトラキス（ α , α , α , α
-o-ピバルアミドフェニル）ポルフィリン鉄（I I）（以下、FeTpivPP錯体
20 という）（J. P. Collman, et al., J. Am. Chem. Soc., 97, 1427 (1975)が
知られている。FeTpivPP錯体は、ベンゼン、トルエン、ジクロロメタン、N,
N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等の有機溶媒中、軸塩基、例
25 えば、1-アルキルイミダゾール、1-アルキル-2-メチルイミダゾール、
ピリジン誘導体等が共存すると、室温で、分子状酸素を可逆的に吸脱着するこ
とができる。しかし、実際にヘモグロビンの代替として酸素輸送能を発揮でき
る人工酸素運搬体（酸素輸液）として生体内での利用まで指向した場合には、
生理条件下（つまり、生理塩水溶液中、pH 7. 4、温度 $\leq 40^{\circ}\text{C}$ ）で、酸素
25 を結合解離できる能力を備えていることが不可欠となる。そこで本発明者らは
、このFeTpivPP錯体またはその類縁体をリン脂質からなる二分子膜小胞体に包
埋させる方法（Dalton Trans., 1984, 1147、特開昭58-21371）、油

滴小球からなるマイクロスフェアに内包または被覆させる方法 (E. Tsuchida, et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1108, 253-256 (1992)、特開平6-264641号公報)、両親媒性置換基を共有結合させて自己組織化させる方法 (特開平6-92966号公報)、または血清アルブミンの疎水ドメインへ包接させる方法 (特開平8-301873号公報)などにより、水中に可溶化し、同時に酸素配位座近傍に構築される微小な疎水環境を活用して、生理条件下でも酸素を可逆的に吸脱着できる酸素輸液として実現することに成功している。また、これを生体内へ投与した場合でも、十分に酸素を輸送できる能力を備えていることを証明している (E. Tsuchida, et. al., *Artif. Organs Today*, 10, 5, 207-215 (1996))。

上述したように、FeTpiVPP錯体が酸素を可逆的に結合解離するためには、過剰モル数の軸塩基配位子を外部から添加する必要があるが、本発明者らは、ポルフィリン鉄 (II) 錯体の分子内へ、置換基として例えばアルキルイミダゾール誘導体、アルキルヒスチジン誘導体を供給結合させることにより、軸塩基を外部から添加しなくとも、安定な酸素錯体を生成できる系を具体化した (特開平5-85141号公報)。軸塩基として広く用いられているイミダゾール誘導体には、薬理作用を持つものがあり、体内毒性の高い場合が多い。また、リン脂質小胞体、リピドマイクロスフェア、アルブミン等を担体とする場合、過剰に共存させたイミダゾール誘導体がその形態を不安定化させる要因ともなり得る。この軸塩基の添加量を極限的に少なくする方法は、分子内に共有結合でイミダゾール誘導体を導入することに他ならなかった。もちろん、これらが生体内に投与できる酸素輸液として機能することも継続して実験的に証明している (E. Tsuchida, et al., *Bioconjugate Chem.*, 11, 46-50 (2000))。

医療分野における酸素輸液の適応範囲は、実に広い。出血ショックの蘇生液 (赤血球代替物) のみならず、心筋梗塞等における虚血部位への酸素供給液、移植臓器の灌流液や保存液、人工心肺等の体外循環回路の補填液、再生組織の培養細胞への酸素供給液などとしての利用にも期待が集まっている。また、近年、癌治療用増感剤としての応用、つまり腫瘍組織の低酸素領域改善効果への

関心も高まっている。

一般に、癌細胞は低酸素細胞であり、悪性腫瘍が放射線療法や化学療法に抵抗性を示す原因のひとつとして、低酸素細胞の存在がある。これには、(i)腫瘍内の血流が一過性に変化し、ある血管の支配領域に血液が一時的に供給されなくなるために生じる急性低酸素細胞と、(ii)新生血管の生成が腫瘍の異常な増殖に追いつかず、血管から離れている細胞に十分な酸素が供給されなくなるために生じる慢性低酸素細胞とが存在する。実際に、酸素の存在下では、腫瘍細胞の放射線感受性が無酸素下よりも3倍高くなり、その生存率も低減する。放射線増感効果は、酸素濃度0 Torrから40 Torrまでの間で頭著であり、それ以上はほとんど変わらない。

酸素効果の作用機序については未だ不明な点も多い。例えば、酸素分子は高い電子親和性を示す強力な酸化剤である。しかし、単純な水溶液中では酸素による放射線感受性は増加せず、標的物質として考えられているDNA分子に水溶液中で放射線を照射してもその酸素効果は現れない。現在のところ、細胞内の酸素効果は、酸素とグルタチオン(GSH)の拮抗によって生じると考えられている。細胞内では、放射線の直接作用あるいは間接作用により細胞内標的分子(DNA)がラジカルを生じ、これが原因で細胞が死滅するとされているが、ラジカルは細胞内に含まれるGSHの還元反応によって減少し、細胞の放射線損傷を修復する。しかし、その際、酸素が多く存在すると、酸素はGSHの作用を阻害し、酸素効果が現れる。

酸素輸液の投与により、低酸素状態にある腫瘍組織の酸素濃度を増大させ、抗癌剤や放射線感受性を高める試みが、これまで報告されている。酸素輸液としてのパーフルオロケミカル(PhC)乳剤の有用性が注目されていた。1982年、穀内らは初めてPFC乳剤と化学療法の併用療法を提案した。脳腫瘍皮下移植モデルラットを用いてPFC乳剤投与による脳腫瘍組織内酸素濃度の変化を検討した(穀内ら、癌と化学療法、11、2207-2211(1984))。PFC乳剤投与に伴い、低酸素組織において、酸素分圧が上昇する。この結果から、末梢組織の酸素分圧を300mmHg以上に保つという条件で、

低酸素腫瘍組織に対するPFC乳剤と放射線療法の併用の有効性を示した。しかしながら、PFC乳剤の酸素親和度は低いために、実際には、高圧テント等の高酸素雰囲気下で使用しなければならないという課題が残った。

他方、Shorrらは、修飾ヘモグロビン（ポリエチレンリコール（PEG）5で修飾した分子量128kDaのヘモグロビン（PEG-Hb）の投与による低酸素腫瘍組織の酸素化、および放射線治療における促進効果を検証した（R. Linberg, C. D. Conover, K. L. Shum, R. G. S. Shorr, *in vivo*, 12, 167-174 (1998)）。腫瘍は、骨肉腫、前立腺癌、肺癌、神経膠腫の4種を対象とし、異なるヘモグロビン製剤の投与による腫瘍酸素濃度変化を測定した。投与2時間後のPEG-Hbが最も低酸素腫瘍組織の酸素濃度を増大（4~7Tor）させることが明らかとなった。そこで、これら放射線感受性の異なる癌を移植したラットにPEG-Hbを投与し、 γ 線を照射し、腫瘍径を経時的に測定したところ、どの腫瘍においても腫瘍径の減少が観察された。これらの結果から、PEG-Hbが、低酸素腫瘍組織内の酸素化と、放射線療法に有効であることが明確となった。しかしながら、一般に、ヘモグロビン製剤は、血管内皮から漏出し易く、平滑筋近傍に存在する血管内皮弛緩因子（一酸化窒素）を捕捉するために、血管収縮を誘起し、急激な血圧亢進を惹起することが知られている。

血管径の細い腫瘍細胞へ到達させるためには、できるだけ小さな粒径の分子からなる酸素輸液が適していることはいうまでもない。つまり、小さな分子であるが、血管内皮や腎から漏れ出し難い分子サイズと物理化学的特徴を兼備した人工酸素運搬体があれば、より効率よく腫瘍組織の低酸素領域を改善できるものと考えられ、それらの条件を満足する酸素輸液の設計と合成、利用上の技術改良と使用法の出現が待たれていたのが現状である。

したがって、本発明は、従来技術の問題点を解消し、腫瘍組織近傍に投与することによって腫瘍内低酸素領域の酸素分圧を効率的に増大させるための安全性の高い酸素輸液製剤を提供しようとすることを主要目的とする。

発明の開示

本発明者らは、より小径であり、しかも血管内皮や腎から漏れ難い特徴を備えた人工酸素運搬体化合物、およびそれを高濃度に分散させた酸素輸液製剤の検索、利用方法、投与方法について鋭意研究を重ねた結果、酸素配位活性中心であるポルフィリン金属錯体を血清アルブミンに包接させて得たポルフィリン金属錯体包接アルブミン化合物が、腫瘍組織内低酸素領域へ高効率で酸素を供給できる製剤となり得るとの知見を得、本発明を完成するに至った。

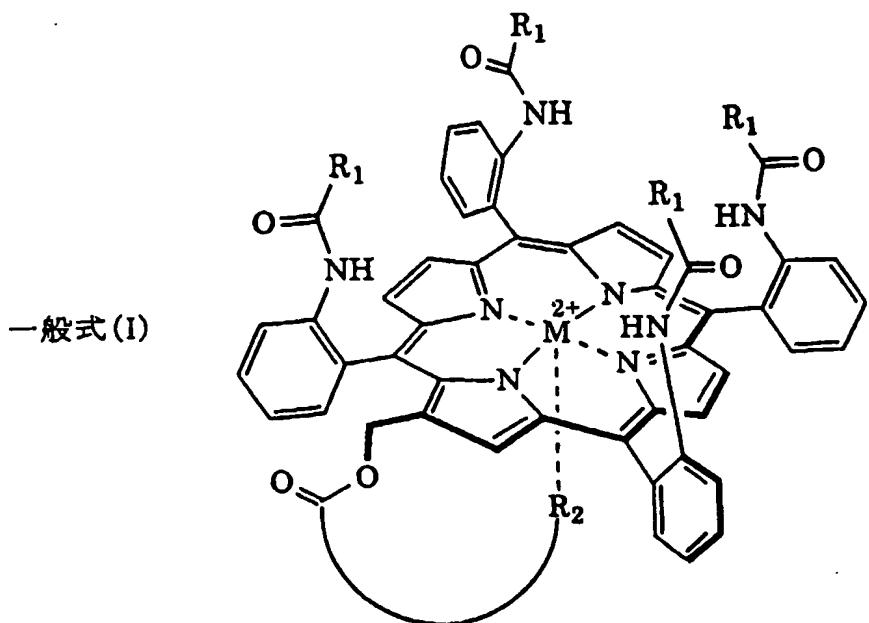
すなわち、本発明によれば、生体内の腫瘍組織の酸素濃度を上昇させるための酸素輸液製剤であって、該酸素輸液製剤は、ポルフィリン金属錯体を包接したアルブミン化合物を生理学的に許容され得る水系媒体に分散させた分散体を包含することを特徴とする酸素輸液製剤が提供される。

以下、本発明をより詳しく説明する。

本発明は、ポルフィリン金属錯体を包接するアルブミン化合物を含む酸素輸液製剤を提供する。この酸素輸液製剤は、ポルフィリン金属錯体を包接するアルブミン化合物を生理学的に許容され得る水系媒体、好ましくはリン酸緩衝生理食塩のような生理食塩水中に分散させた分散体から構成され得る。

本発明において使用されるポルフィリン金属錯体は、好ましくは、一般式(I)：

[化 1]

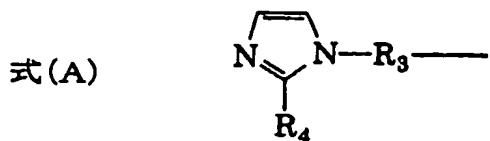


[一般式 (I) において、

R1 は、置換基を有していてもよい鎖式もしくは脂環式炭化水素基であり

R2 は、式 (A) :

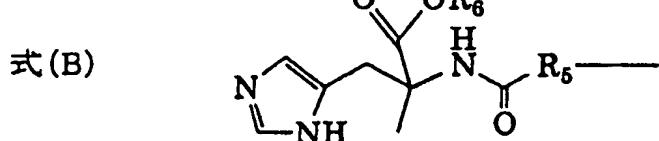
5 [化2]



10 (ここで、R3 は、アルキレン基、R4 は、当該軸塩基配位子の中心遷移金属イオンMへの配位を阻害しない基) で示される軸塩基配位子、または式 (B)

[化3]

15



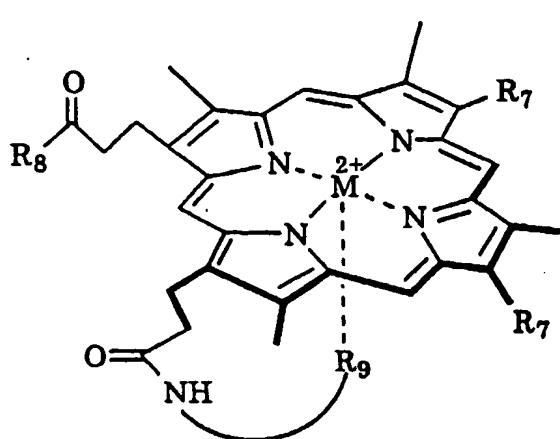
(ここで、R5 は、アルキレン基、R6 は、アルキル基) で示される軸塩基配位子であり、

20 Mは、周期律表第4～第5周期の遷移金属イオンである] で示されるポルフィリン金属錯体、および／または一般式 (II) :

[化4]

25

一般式 (II)



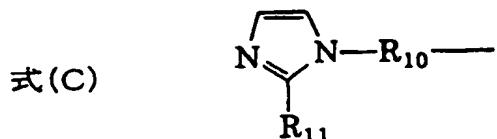
[一般式 (II) において、

R7 は、水素原子、または置換基を有していてもよい鎖式炭化水素基であり、

R8 は、アルキルオキシ基、アルキルアミノ基、またはアミノ酸基もしく
5 はアミノ酸誘導体残基であり、

R9 は、式 (C) :

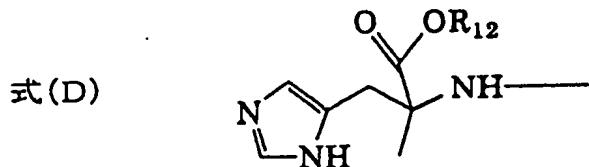
[化5]



10

(ここで、R10は、アルキレン基、R11は、当該軸塩基配位子の中心遷移金属イオンMへの配位を阻害しない基) で示される軸塩基配位子、または式 (D)

15 [化6]



20 (ここで、R12は、アルキル基) で示される軸塩基配位子であり、

Mは、周期律表第4～第5周期の遷移金属イオンである] で示されるポルフィリン金属錯体である。

これらポルフィリン金属錯体は、酸素配位活性中心を構成する。

一般式 (I) のポルフィリン金属錯体において、R1 は、1位にジメチル基を有するC1～C19の鎖式炭化水素基または1位に置換基を有するC3～C19の脂環式炭化水素基であることが好ましい。後者の脂環式炭化水素の具体例を挙げると、1-置換シクロプロピル基、1-置換シクロペンチル基、1-置換シクロヘキシル基、1-メチル-2-シクロヘキセニル基、2-置換ノルポル

ニル基、1-アダマンチル基であり、ここで、各置換基は、メチル基、C1～C18のアルキルアミド基、C1～C18アルカノイルオキシ基、C1～C18のアルコキシ基であり得る。

R3は、C1～C10のアルキレン基であることが好ましい。

5 R4は、水素原子、メチル基、エチル基またはプロピル基であることが好ましい。

R5は、C1～C10のアルキレン基であることが好ましい。

R6は、C1～C18のアルキル基であることが好ましい。

10 また、一般式(I I)のポルフィリン金属錯体において、R7は、水素原子、ビニル基、エチル基またはメトキシ基であることが好ましい。

R8は、C1～C18のアルキルオキシ基、C1～C18のアルキルアミノ基またはアミノ酸もしくはその誘導体残基であることが好ましい。アミノ酸誘導体としては、アミノ酸-O-C1～C18アルキルエステルが好ましい。

R10は、C1～C10のアルキレン基であることが好ましい。

15 R11は、水素原子、メチル基、エチル基またはプロピル基であることが好ましい。

R12は、C1～C18のアルキル基であることが好ましい。

一般式(I)および(I I)において、Mは、いずれも、FeまたはCoであることが好ましい。

20 一般式(I)で示されるポルフィリン金属錯体は、特開平6-271577号公報、T. Komatsu et al., Chem. Lett., 2001, 668-669 (2001)等に記載されている。

一般式(I I)で示されるポルフィリン金属錯体は、R8がアルキルアミノ基であるものを除いて、T. G. Traylor et al., J. Am. Chem. Soc., 101, 6725 16-6731 (1979)、特開昭58-10388号公報、特開昭60-17326号公報等に開示されている。R8がアルキルアミノ基であるポルフィリン金属錯体の合成例は、後の実施例の項に示されている。

ポルフィリン金属錯体を包接するアルブミン化合物としては、ヒト血清アル

ブミン、遺伝子組み換えヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン等の血清アルブミンを使用することができ、さらに、アルブミン化合物としては、は多量体の形態にあるアルブミンを使用することもでき、特に二量体の形態にあるアルブミンを使用することが好ましい。アルブミン二量体を使用することにより
5 、包接化合物の循環系からの漏出がより一層抑止される。

ポルフィリン金属錯体をアルブミン化合物に包接させ、酸素輸液製剤を得るためにには、特開平8-301873号公報やE. Tsuchida et al., *Bioconjugate Chem.*, 10, 797-802 (1999)、*Bioconjugate Chem.*, 11, 46-50 (2000)に開示されている方法を採用することができる。本発明の酸素輸液製剤は、アルブ
10 ミン化合物を通常1～30重量%、好ましくは5～25重量%の濃度で含有することが望ましい。アルブミン化合物1分子に対するポルフィリン金属錯体の結合数は、1～8（モル／モル）であるから、ポルフィリン金属錯体の濃度は、0.15～3.6 mMとなる。本発明の酸素輸液製剤の投与量は、40 mL／kg 体重以下とすることが適切である。

15 本発明の酸素輸液製剤は、(i) 血漿タンパク質の約60%を占める血清アルブミンを酸素配位活性中心であるポルフィリン金属錯体のキャリヤーとして用いているため、血管内の投与に際し、きわめて高い安全性と生体適合性を有するのみならず、(ii) 分子径が8×3 nmと小さいため、赤血球(8 μm)の到達し得ない腫瘍細胞の微小毛細血管内でも流動することができ、(ii
20 i) しかも、低い等電点(pI)を持つので、腎や血管内皮からは漏出し難いという腫瘍組織の酸素化に必要な好条件を兼ね備えている。

また、ポルフィリン金属錯体立体構造を制御することにより、酸素親和度が制御できるので、患部の酸素分圧に応じて、より高い効率で酸素を輸送できる。

25 本発明の酸素輸液製剤は、腫瘍組織を有する哺乳動物生体内に投与することにより、その腫瘍組織における低酸素領域の酸素分圧を高めることができる。

本発明の酸素輸液製剤は、動注、静注、局所投与、全身投与その他の投与方法で生体内に投与することができる。いうまでもなく、投与に際しては、ポル

フィリン金属錯体の中心金属を酸素化しておく。

腫瘍組織を有する哺乳動物に本発明の酸素輸液製剤を投与し、その腫瘍組織における低酸素領域の酸素分圧を向上させる方法の一実験例をより詳しく説明すると次の通りである。

5 実験動物、例えば、ラット、ハムスター、家兎、ビーグル犬等の部位へ腫瘍細胞を移植し、担癌動物を作製する。以下、ラットの右大腿に移植する場合について記述する。

腫瘍が成長するまでラットを数日間飼育し、麻酔（例えば、ネンプタール、ジエチルエーテル、ハロセン麻酔ガス等を使用）下に実験を行う。頸部気管から挿管し、人工呼吸器で陽圧換気し、左頸動脈にポリエチレンカテーテルを総腸骨動脈分岐部手前まで挿入し、逆行カニュレーションを施して、下行大動脈に試料投与ラインを確保する。

腫瘍組織内酸素分圧は、例えば燐光プローブ（パラジウムコプロポルフィリン（PdPor）等を静注した後、光照射し、燐光の減衰消滅時間から、酸素分圧測定装置を用いて測定することができる。PdPorは、試料投与の5～20分前に尾静脈より静注する。正常筋肉と腫瘍の両方が露出する20mmの小切開を大腿におき、測定用プローブを腫瘍直上に設置し、37℃の温生理食塩水で腫瘍表面を濡らすことにより乾燥を防ぎながら測定を継続する。空気下、および酸素濃度99%の雰囲気下の右脚腫瘍部の酸素分圧を酸素分圧測定装置（例えば、Medical System Corp. 製のOxySpot）を用いて5～30箇所測定し、コントロールとする。その後、酸素飽和させた試料（1～20mL/kg）をシリンジポンプを用いて定圧下、1～20分間で動注する。動注開始と同時に腫瘍部および正常部の酸素分圧の経時変化を測定する。測定終了後、腹部を切開し、試料動注カテーテルが総腸骨動脈分岐部手前付近にあることを確認し、腫瘍の大きさも測定する。

この場合、酸素飽和させた生理食塩水、ヒト血清アルブミン、遺伝子組み換えヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、アルブミン二量体等を動注しても腫瘍組織の酸素分圧（PO2）には変化が見られない。これに対して、本発

明のポルフィリン金属錯体包接アルブミン化合物を含む酸素輸液製剤を投与すると、腫瘍組織の酸素分圧は、有意に上昇する。本発明のポルフィリン金属錯体包接アルブミン化合物は、上に述べたように、粒子径が小さいため、変則的な腫瘍組織内血管を、赤血球よりも容易に通過できるので、腫瘍組織内の酸素分圧を効率的に上昇させることができると考えられる。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の酸素輸液製剤の投与による腫瘍組織における酸素分圧の変化を示すグラフである。

10

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例により説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

合成例A：8, 13-ビスピニル-2-メチルアミノカルボニルエチル-1

15 8-(3-(1-イミダゾリル)プロピルアミノ)カルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチルポルフィリン鉄錯体の合成

(I) 8, 13-ビスピニル-2-メチルアミノカルボニルエチル-18-(3-(1-イミダゾリル)プロピルアミノ)カルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチルポルフィリンの合成

20 100mLの三口ナスフラスコに、プロトポルフィリンIX(0.1g、0.18mmol)、蒸留ピリジン(10mL)、トリエチルアミン(51μL、0.45mmol)を加え、10分間攪拌した。これに、(ベンゾトリアゾリルオキシ)トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(124mg、0.45mmol)を加え、10分間攪拌し、1-(3-アミノプロピル)イミダゾール(15μL、0.14mmol)を添加し、遮光下で4時間攪拌した。これに、さらにメチルアミンのテトラヒドロフラン溶液5mLを添加して、さらに4時間攪拌した。真空ポンプでピリジンを減圧除去し、シリカゲルカラム(クロロホルム/メタノール/トリエチルアミン=8

／1／1）で分画精製した。得られた画分を真空乾燥し、赤色固体である8, 13-ビスビニル-2-メチルアミノカルボニルエチル-18-（3-（1-イミダゾリル）プロピルアミノ）カルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチルポルフィリンを24mg（収率19%）を得た。

5 R_f : 0.6 (クロロホルム/メタノール=3/1)

IR (cm⁻¹) : ν_{C=O} (アミド) : 1631

UV-vis / λ_{max} (nm) (CHCl₃) : 631; 579; 542; 508; 409

1H-NMR (δ (ppm)) (CDCl₃) : -4.0 (s, 2H, inner); 1.8-2.4 (m, 4H, -C₂H₄-Im); 2.7 (m, 4H, -CH₂-COO-, -CH₂-NH-); 3.5-3.7 (m, 15H,

10 Por-CH₃, CONHCH₃); 4.2 (s, 4H, Por-CH₂-); 5.8 (s, 1H, Im); 6.1-6.4 (q, 4H, CH₂=CH-); 6.6 (d, 1H, Im); 8.2 (m, 2H, CH₂=CH-); 9.5-10.0 (q, 4H, meso)

FAB-MAS [m/z] : 683。

(I I) 鉄錯体の合成

15 50mLの三口ナスフラスコに上記(I)で得たポルフィリン化合物 (23.9mg, 34.6 μmol) のジメチルホルミアミド溶液5mLを入れ、20分間窒素で脱気した。これに、塩化鉄四水和物 (68.8mg, 346 μmol) をすばやく添加し、窒素雰囲気下で、70℃で3時間攪拌した。反応の完了は、反応溶液のクロロホルム希釈溶液に塩酸を一滴加え、その紫外-可視スペクトルにジカチオン由来のピーク (450nm付近) が出現しないことにより確認した。真空ポンプで溶媒を減圧除去し、シリカゲルカラム (クロロホルム/メタノール/トリエチルアミン=8/1/1) で分画精製し、真空乾燥後、褐色固体を7

6mg (収率29%) 得た。

25 R_f : 0.1 (クロロホルム/メタノール/トリエチルアミン=8/1/1)

IR (cm⁻¹) : ν_{C=O} (アミド) : 1649

UV-vis / λ_{max} (nm) (CHCl₃) : 583; 531; 406

FAB-MAS [m/z] : 736。

合成例B: 8, 13-ビスピニル-2-ドデシルアミノカルボニルエチル-18-(メチル-O-ヒスチジン)カルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチルポルフィリン鉄錯体の合成

5 合成例Aの(I)において、1-(3-アミノプロピル)イミダゾールの代わりに、ヒスチジン-O-メチルエステルを用い、メチルアミンの代わりにドデシルアミンを用いた以外は、同様にして、8, 13-ビスピニル-2-ドデシルアミノカルボニルエチル-18-(メチル-O-ヒスチジン)カルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチルポルフィリンを収率25%で得た
10 。

Rf : 0.4 (クロロホルム/メタノール=15/1)

IR (cm⁻¹) : νc=0 (アミド) : 1640

UV-vis / λ_{max} (nm) (CHCl₃) : 631; 575; 540; 409

15 ¹H-NMR (δ (ppm)) (CDCl₃) : -4.0 (s, 2H, inner); 0.8 (s, 3H, -(CH₂)₁₀CH₃); 1.2-1.8 (m, 20H, -CH₂-); 1.9 (t, 4H, -CH₂(C=O)NH-); 3.2 (s, 2H, -Im-CH₂-); 3.3 (t, 2H, -(C=O)NHCH₂-); 3.5-3.7 (m, 12H, Por-CH₃); 3.7 (m, 3H, His-OMe); 4.2 (s, 4H, Por-CH₂-); 4.8 (s, 1H, His-C₂CH-); 6.1-6.4 (q, 4H, CH₂=CH-); 6.8 (s, 1H, Im); 7.6 (s, 1H, Im); 8.2 (m, 2H, CH₂=CH-); 9.5-10.0 (q, 4H, meso)

20 FAB-MAS [m/z] : 881。

得られたポルフィリンを用いて、合成例Aの(II)と同様にして、その鉄錯体を合成した。

[実施例1]

<本発明の酸素輸液製剤の調製>

25 ヒト血清アルブミン(25重量%) 10mL (2.5mg, 37.5μmol)、リン酸緩衝生理食塩水(pH8.1) 1Lをセパラブルフラスコ(2L)に入れ、500mLの滴下漏斗を装着した。別のナス型フラスコ(300mL)に2-8-(2-メチル-1-イミダゾリル)オクタノイルオキシメチル-

5, 10, 15, 20-テトラキス (α , α , α , α -o-ピバロイルアミドフェニル) ポルフィリン鉄 (II) 錯体 (以下、FepivP(Im)) 390 mg、300 μ mol) のエタノール溶液 250 mLを入れ、先のセパラブルフラスコとテフロンチューブで連結し、そのチューブを液面に接触しないようにした。

5 FepivP(Im)のエタノール溶液の入ったナス型フラスコ側に一酸化炭素をバブルし、排気をアルブミン水溶液側に流した。同時に、アルブミンの溶液が泡立たない程度に行った。このバブリングと排気のフローは、約60分間行った。一酸化炭素霧囲気下で、FepivP(Im)のエタノール溶液にアスコルビン酸水溶液 (0.6 M) を250 μ L加え、5分間攪拌した。こうしてヘムが還元されて一酸化炭素錯体を形成するので、溶液の色は鮮紅色に変化した。

この一酸化炭素化したFepivP(Im)のエタノール溶液をセパラブルフラスコに装着した滴下漏斗に移し、ゆっくりとアルブミン水溶液中に滴下した。滴下終了後、さらに30分間攪拌した。

以後の操作はアルミホイル等を使って遮光下で行った。循環式限外ろ過装置 (PELLICON-2 MINI HOLDER, Cat. NO. XX42PMINI) に膜面積 0.1 m²、分画分子量 10 kDa の限外ろ過膜 P2B010A01 (MILIPORE) を装着し、得られたアルブミン-ヘムの 20% エタノール溶液 1.25 L をろ過した。ろ過液が 50 mL 出た時点でリン酸緩衝液 (1 mM, pH 7.3) を 50 mL 加えた。この操作を 10 L (1.25 × 8 L) のリン酸緩衝液が透過するまで繰り返した。その後、アルブミン-ヘム溶液を約 100 mL まで濃縮し、溶液を容器に回収した。

このようにして得た濃縮液 (約 200 mL) をフィルター (DISMIC 0.45 μ m) でろ過し、ろ液を限外ろ過器 (UHP-76K, ADVANTEC) で、溶液量が約 50 mL になるまで濃縮した。

25 得られた濃縮溶液に、塩化ナトリウム濃度が 140 mM となるように、20 重量%濃度の塩化ナトリウム水溶液を加えた。

このアルブミン-ヘム溶液の pH、Na⁺ 濃度を pH メーター、塩メーターにより測定した。アルブミン濃度は、プロモクレゾールグリーン (BCG) 法

により、FepivP(Im)濃度は、ICP(誘導結合プラズマ)発光分析による定量から測定した。

アルブミン-ヘム(一酸化炭素錯体)溶液(20mL)を100mLナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターに取り付けた。ナス型フラスコを5氷水浴で冷やしながら、回転させ、冷却管の上部コックから酸素を20分間通気(フロー)した。その後、ハロゲンランプ(500W)を、回転しているナス型フラスコの15~20cm上に固定し、アルブミン-ヘム溶液に10分間光照射した。アルブミン-ヘム溶液の紫外可視スペクトルのλ_{max}と吸光度から酸素錯体の生成を確認した。得られた酸素錯体のモル吸光係数(ε426)は10、およそ1.16×105M⁻¹cm⁻¹であった。

<正常細胞および腫瘍細胞における酸素分圧の測定>

ドンリュウラット(Crj-Donryu: Nippon Charles River)(雄、体重約200g、6週齢)をバイオクリーンシステムにより固形飼料および水分の自由摂取下で飼育し、これを用いた。移植腫瘍細胞は、Ascites hepatoma LY80を腹腔内継代移植し、担癌ラット作製には、移植後7日目の細胞を採取し、これを用いた。移植8日前に、ラット右大腿に小切開をおき、27Gと1mLシリンジを用いて大腿筋直下に5×10⁶細胞(0.05mL)を移植した。腫瘍組織内酸素分圧は、パラジウムコプロポルフィリン(PdPor)を静注した後15、光照射し、熒光の減衰消滅時間から酸素分圧測定装置(Oxyspot Photometric 20 Oxygen Measurement System(OxySpot, Medical System Corp.))を用いて測定した。PdPorは、試料投与の15分前に尾静脈より24Gサーフロー針を用いて静注した。正常筋肉と腫瘍の両方が露出する20mmの小切開を大腿におき、測定用プローブは腫瘍直上から5mmの位置に設置し、37℃の温生理食塩水で腫瘍表面を洗浄することにより、乾燥を防ぎながら測定を行った。

25 エーテル吸入麻酔後、頸部気管から14G-Angiocathを挿管し、ハロセン麻酔ガス(FiO₂、1%ハロタンフローセン)を空気または酸素に1%混合したガスを、Small Animal Anesthetizerで送入し、人工呼吸器(シナノ製作所製Respirator Model SN 480-7)で陽圧換気を行った(80回/分)。左頸動脈に

ポリエチレンカテーテル (SP 10、シングルルーメン、内径0.28mm、外径0.61mm) を総腸骨動脈分岐部の1cm手前まで挿入し (約9.5cm) 、逆行カニュレーションを施して、下行大動脈に試料投与ラインを確保した。

5 右脚腫瘍細胞の皮膚を剥離し、PdPor (0.24cc (10mg/mL、0.9mL/kg)) をラットの尾静脈から注入し、空気下および酸素濃度99%の雰囲気下の右脚腫瘍部の酸素分圧をOxySpotを用いて20箇所測定し、コントロールとした。その後、酸素飽和させた試料 (10mL/kg) シリンジポンプ (FP-W-100、Matys、東洋産業(株)) を用いて定圧下、
10 4分間で動注した (2.5mL/kg/分)。動注開始と同時に腫瘍部および正常部の酸素分圧の経時変化を測定した (それぞれ5点ずつ、15分間)。測定終了後、腹部を切開し、試料動注カテーテルが総腸骨動脈分岐部手前付近にあることを確認し、腫瘍の大きさも測定した。

99%酸素雰囲気下での右脚正常部および右脚腫瘍部の酸素分圧 (PO2) 15 は、表1に示すように、それぞれ、14~16 Torr および1.4~1.7 Torr であり、腫瘍部の酸素分圧は、正常組織に比較して著しく低く、単にラットの呼吸中酸素濃度を高めただけでは、酸素分圧は上昇しないことを確認した。

20 rHSA-ヘム投与群 (4匹) およびrHSA投与群 (4匹) についての種々のパラメータの基礎値を下記表1に示す。

[表1]

	r HSA-ヘム投与群	r HSA投与群
体重 (g)	213±4.2	203±6.3
腫瘍径 (mm)	16.5×14.0	19.0×14.0
PO ₂ (Torr) (腫瘍細胞)	1.4±0.2	1.7±0.2
PO ₂ (Torr) (腫瘍細胞)	15.7±2.3	14.8±2.8
血液ガスパラメーター：		
pH	7.41±0.04	7.42±0.04
PO ₂ (Torr)	394±73	402±60
PCO ₂ (Torr)	34.6±4.2	33.0±2.8

次に、まず、酸素飽和させた遺伝子組み換えヒト血清アルブミン (r HSA) を動注したところ、腫瘍組織の酸素分圧 (PO₂) に変化はなかった。これ
5 に対して、上で調製した本発明の酸素輸液製剤を投与すると、腫瘍組織の酸素分圧は、3.5 Torrまで上昇した。これらの結果を図1に示す。本発明の酸素輸液製剤を投与した後の値は、投与前の値の2.5倍に相当する。本発明のポルフィリン金属錯体包接アルブミン化合物は、上に述べたように、粒子径が小さいため、変則的な腫瘍組織内血管を、赤血球よりも容易に通過できるの
10 で、腫瘍組織内の酸素分圧を効率的に上昇させることができると考えられる。

[実施例2]

実施例1で用いたFepivP(Im)の代わりに、2-8-(1-イミダゾリル)オクタノイルオキシメチル-5,10,15,20-テトラキス(α,α,α,
15 α-o-(1-メチルシクロヘキサノイル)アミノフェニル)ポルフィリン鉄(I I)錯体を用いた以外は同様の手法により、腫瘍組織の低酸素領域の酸素供給効果を観測した。腫瘍組織の酸素分圧は、約7.0 Torrまで上昇した。かくして、人工酸素運搬体であるアルブミン-ヘム投与による低酸素腫瘍組織への酸素供給効果が実証された。

[実施例3]

実施例1で用いたFepivP(Im)の代わりに、8, 13-ビスビニル-2-メトキシカルボニルエチル-18-(3-(1-イミダゾリル)プロピルアミノ)カルボニルエチル-3, 7, 12, 17-テトラメチルポルフィリン鉄(II)錯体を用いた以外は同様の手法により、腫瘍組織の低酸素領域の酸素供給効果を観測した。腫瘍組織の酸素分圧は、約1.6 Torrまで上昇した。かくして、人工酸素運搬体であるアルブミン-ヘム投与による低酸素腫瘍組織への酸素供給効果が実証された。

産業上の利用可能性

以上述べたように、本発明によれば、腫瘍組織近傍に投与することによって腫瘍内低酸素領域の酸素分圧を効率的に増大させるための安全性の高い酸素輸液製剤が提供される。

請求の範囲

1. 生体内の腫瘍組織の酸素濃度を上昇させるための酸素輸液製剤であって、該酸素輸液製剤は、ポルフィリン金属錯体を包接したアルブミン化合物を生理学的に許容され得る水系媒体に分散させた分散体を包含することを特徴とする

5 酸素輸液製剤。

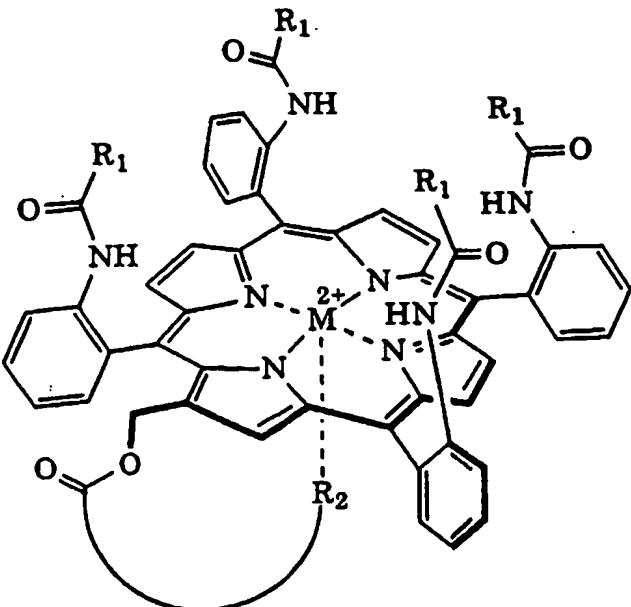
2. 前記ポルフィリン金属錯体が、一般式 (I) :

一般式 (I) :

[化7]

10

一般式 (I)



15

20

[一般式 (I) において、

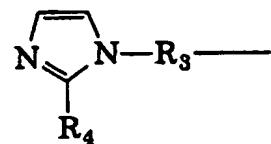
R₁ は、置換基を有していてもよい鎖式もしくは脂環式炭化水素基であり

R₂ は、式 (A) :

25

[化 8]

式(A)



5

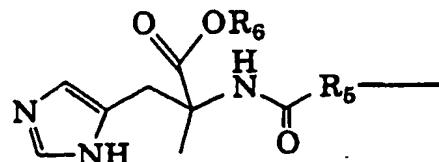
(ここで、R3は、アルキレン基、R4は、当該軸塩基配位子の中心遷移金属イオンMへの配位を阻害しない基)で示される軸塩基配位子、または式(B)

:

[化 9]

10

式(B)

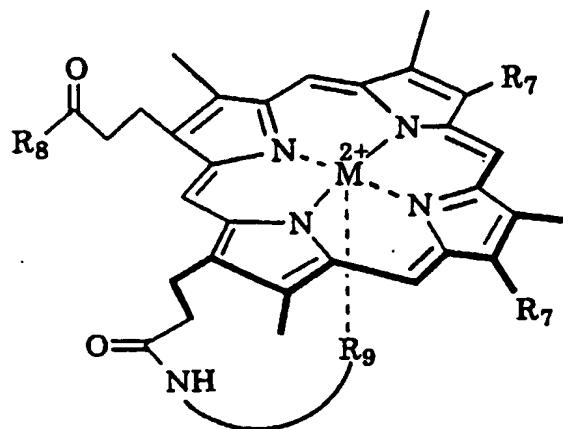


15 (ここで、R5は、アルキレン基、R6は、アルキル基)で示される軸塩基配位子であり、

Mは、周期律表第4～第5周期の遷移金属イオンである]で示されるポルフィリン金属錯体、および／または一般式(II)：

[化 10]

一般式(II)



25

[一般式(II)において、

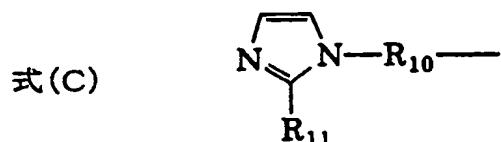
R7は、水素原子、または置換基を有していてもよい鎖式炭化水素基であ

り、

R8 は、アルキルオキシ基、アルキルアミノ基、またはアミノ酸基もしくはアミノ酸誘導体残基であり、

R9 は、式 (C) :

5 [化 1 1]

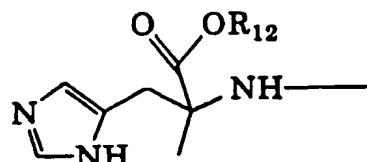


10 (ここで、R10は、アルキレン基、R11は、当該軸塩基配位子の中心遷移金属イオンMへの配位を阻害しない基) で示される軸塩基配位子、または式 (D)

[化 1 2]

15

式(D)



(ここで、R12は、アルキル基) で示される軸塩基配位子であり、

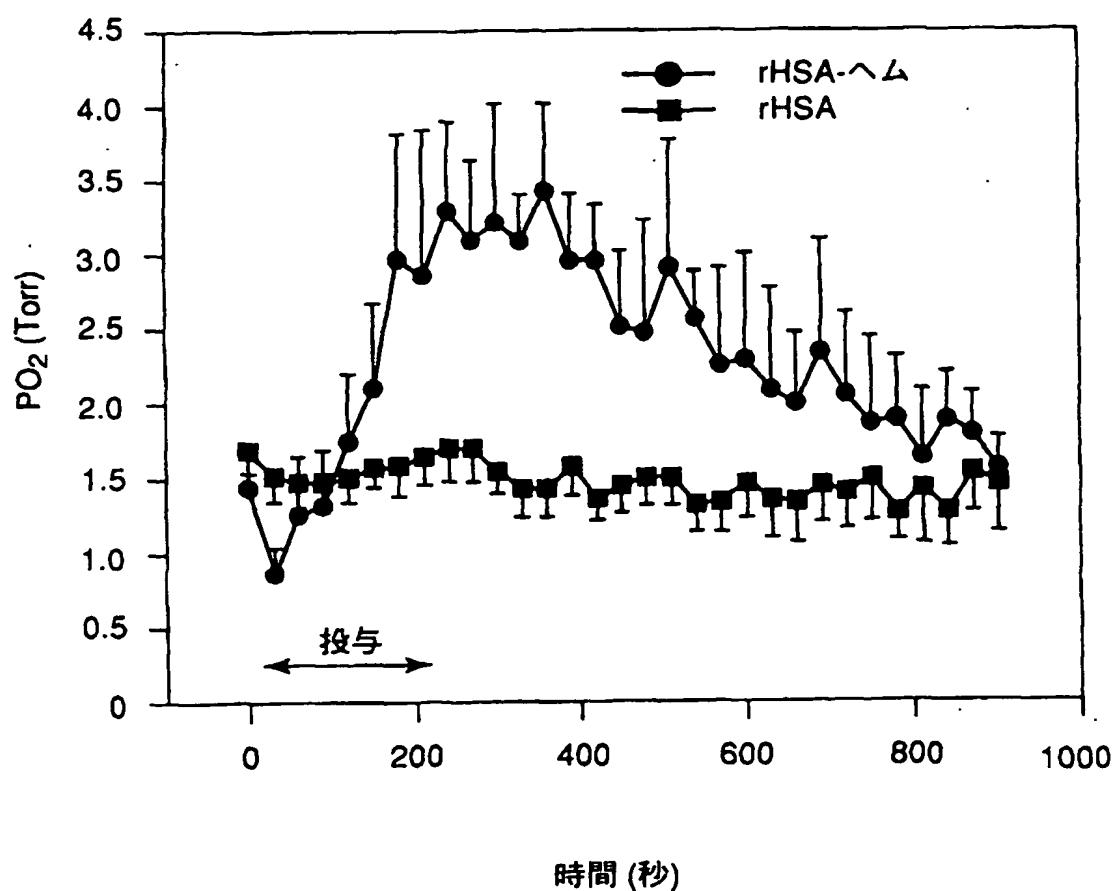
Mは、周期律表第4～第5周期の遷移金属イオンである] で示されるポル20 フィリン金属錯体であることを特徴とする請求項1に記載の酸素輸液製剤。

3. 一般式 (I) のポルフィリン金属錯体において、R1 が、1位にジメチル基を有するC1～C19の鎖式炭化水素基または1位に置換基を有するC3～C19の脂環式炭化水素基であり、R3 が、C1～C10のアルキレン基であり、R4 が、水素原子、メチル基、エチル基またはプロピル基であり、R5 が、C1～C10のアルキレン基であり、R6 が、C1～C18のアルキル基であり、Mが、Fe またはCo である請求項2に記載の酸素輸液製剤。

4. 一般式 (II) のポルフィリン金属錯体において、R7 が、水素原子、ビニル基、エチル基またはメトキシ基であり、R8 が、C1～C18のアルキルオ

キシ基、C1～C18のアルキルアミノ基またはアミノ酸もしくはその誘導体残基であり、R10が、C1～C10のアルキレン基であり、R11が、水素原子、メチル基、エチル基またはプロピル基であり、R12は、C1～C18のアルキル基であり、Mが、FeまたはCoである請求項2に記載の酸素輸液製剤。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K31/409, 9/107, 47/48, 41/00, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K31/409, 9/107, 47/48, 41/00, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	EP 739634 A2 (THE GREEN CROSS CORP.), 30 October, 1996 (30.10.96), Full text & JP 08-301873 A & US 6008198 A & CA 2175115 A	1-4
X, Y	TSUCHIDA Eishun et al., Human Serum Albumin Incorporating Tetrakis(o-pivalamido) Phenyl porphinatoiron(II) Derivative as a Totally Synthetic O ₂ -Carrying Hemoprotein, Bioconjugate Chem., (1999), Vol.10, No.5, pages 797 to 802	1-3

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 30 July, 2003 (30.07.03)	Date of mailing of the international search report 12 August, 2003 (12.08.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/06991

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	TSUCHIDA Eishun et al., Exchange Transfusion with Albumin-Heme as an Artificial O ₂ -Infusion into Anesthetized Rats: Physiological Responses, O ₂ -Delivery, and Reduction of the Oxidized Hemin Sites by Red Blood Cells, Bioconjugate Chem., (2000), Vol.11, No.1, pages 46 to 50	1-3
Y	WO 95/21845 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 17 August, 1995 (17.08.95), Full text & JP 10-500659 A & EP 745085 A1 & US 5599923 A & DE 69526782 A	1-4
Y	WO 00/33833 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.), 15 June, 2000 (15.06.00), Full text & JP 2002-531497 A & EP 1137411 A1 & US 6569846 B1 & CN 1334728 A & AU 200015834 A	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K31/409, 9/107, 47/48, 41/00, A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K31/409, 9/107, 47/48, 41/00, A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, Y	EP 739634 A2 (THE GREEN CROSS CORPORATION) 1996.10.30 全文参照 &JP 08-301873 A &US 6008198 A &CA 2175115 A	1-4
X, Y	TSUCHIDA Eishun et al., Human Serum Albumin Incorporating Tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) Derivative as a Totally Synthetic O ₂ -Carrying Hemoprotein, Bioconjugate Chem, (1999), Vol.10, No. 5, p. 797-802	1-3

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.07.03

国際調査報告の発送日

12.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

根本 佳予子



4 P 9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X, Y	TSUCHIDA Eishun et al., Exchange Transfusion with Albumin-Heme as an Artificial O ₂ -Infusion into Anesthetized Rats: Physiological Responses, O ₂ -Delivery, and Reduction of the Oxidized Hemin Sites by Red Blood Cells, Bioconjugate Chem, (2000), Vol.11, No.1, p. 46-50	1-3
Y	WO 95/21845 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 1995.08.17 全文参照 &JP 10-500659 A &EP 745085 A1 &US 5599923 A &DE 69526782 A	1-4
Y	WO 00/33833 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 2000.06.15 全文参照 &JP 2002-531497 A &EP 1137411 A1 &US 6569846 B1 &CN 1334728 A &AU 200015834 A	1-4